

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität
in Marburg
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. H. Kaffarnik

EINFLUSS ORAL APPLIZIERTER ESSENTIELLER
PHOSPHOLIPIDE AUF DIE DURCH CLOFIBRAT THERAPIE
INDUZIERTEN VERÄNDERUNGEN IN LIPIDGEHALT
UND ZUSAMMENSETZUNG DER PLASMALIPOPROTEINE
BEI HYPERLIPIDÄMISCHEN PATIENTEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von —

RUTHILD MÜLLER-METZLER
—
aus Sinn

Marburg 1977
—

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität
in Marburg

Komm. Direktor: Prof. Dr. med. H. Kaffarnik

EINFLUSS ORAL APPLIZIERTER ESSENTIELLER
PHOSPHOLIPIDE AUF DIE DURCH CLOFIBRAT THERAPIE
INDUZIERTEN VERÄNDERUNGEN IN LIPIDGEHALT
UND ZUSAMMENSETZUNG DER PLASMALIPOPOTEINE
BEI HYPERLIPIDÄMISCHEN PATIENTEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

RUTHILD MÜLLER-METZLER

aus Sinn

Marburg 1977

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 27.5.1977

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan:	Prof. Dr. med. F. Neurath
Referent:	Prof. Dr. med. H. Kaffarnik
Correferent:	Prof. Dr. med. dent. H.F.M. Schmidt

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung und Fragestellung	1
2. Methodik	3
2.1. Blutprobengewinnung	3
2.1.1. Patienten	3
2.1.2. Versuchsbedingungen	3
2.1.3. Dosierung	4
2.2. Blutprobenverarbeitung	4
2.2.1. Plasmagewinnung und -lagerung	4
2.2.2. Plasmaverarbeitung	4
2.3. Präparative Ultrazentrifugation	5
2.4. Bestimmung der Phosphatide	12
2.5. Bestimmung der Triglyceride	15
2.6. Bestimmung des Gesamtcholesterins	19
3. Statistik	22
4. Ergebnisse	24
5. Diskussion	35
6. Zusammenfassung	37
7. Anhang	38
8. Literaturverzeichnis	39

Abkürzungen und Bezeichnungen

ADP	=	Adenosindiphosphat
ATP	=	Adenosintriphosphat
CH	=	Cholesterin
EPL	=	essentielle Phospholipide
GK	=	Glycerinkinase
HDL	=	high density lipoproteins Lipoproteine mit hoher Dichte
LDL	=	low density lipoproteins Lipoproteine mit niedriger Dichte
NAD ⁺	=	Nikotinamiddinucleotid
NADH	=	Nikotinamiddinucleotid reduziert
PEP	=	Phosphoenolpyruvat
PK	=	Pyruvatkinase
PL	=	Phospholipide
TG	=	Triglyceride
UZ	=	Ultrazentrifuge
VLDL	=	very low density lipoproteins Lipoprotein mit sehr geringer Dichte

1. EINLEITUNG und FRAGESTELLUNG

Die medikamentöse Plasmalipidsenkung mit Clofibratderivaten wie mit anderen lipidsenkenden Pharmaka hat zu uneinheitlichen Ergebnissen in der Langzeitprognose von Coronarkranken oder gegenüber coronaren Herzkrankheiten gefährdeten Risikoträgern geführt (8, 10, 11, 15, 19, 21, 22). Verschiedene Gründe für die nur teilweise überzeugenden Erfolge in der primären und sekundären Prävention sind in letzter Zeit vielerorts diskutiert worden (8, 32). Auf eine weitere Erklärungsmöglichkeit haben die Untersuchungsergebnisse von L.A. CARLSON und Mitarbeitern (9) und anderen Autoren über den VLDL-Katabolismus und die Interkonversion verschiedener Lipoproteine unterschiedlicher Atherogenität hingewiesen. Ein aufsehenerregender Befund in dieser Hinsicht ist die Mitteilung von ROSE et al. (25), daß Clofibrat bei Patienten mit Hyperlipoproteinämie vom Typ IIb und IV zwar eine Verminderung der VLDL, jedoch eine Erhöhung der LDL hervorruft (bei Senkung des Gesamtcholesterins und der Gesamttriglyceride). Diese Ergebnisse sind aber auf Grund der molekularen Zusammensetzung der verschiedenen Lipoproteine durchaus verständlich (siehe Tabelle 1) und konnten in einer Untersuchung an einem größeren Patientenkollektiv zumindest teilweise bestätigt werden (6).

Da eine LDL- oder β -Lipoproteinvermehrung bei der Prävention von atherosklerotischen Folgekrankheiten bei Patienten mit erhöhten Plasmalipiden keinesfalls gewünscht oder toleriert werden kann, stellt sich die Frage, ob dieser unerwünschte Nebeneffekt durch eine Begleitmedikation mit anderen, den Lipidstoffwechsel beeinflussenden Medikamenten möglich ist. In Betracht kommen in erster Linie Pharmaka mit isolierter Wirkung auf die β -Lipoproteine oder LDL, aber auch andere, in den Cholesterinstoffwechsel eingreifende Medikamente oder diätetische Maßnahmen.

Die Wirkungsweise des am häufigsten verordneten lipidsenkenden Medikaments, der Clofibrinsäure, ist beim Menschen in vivo noch nicht geklärt.

In der vorliegenden Untersuchung wurde der Einfluß essentieller Phospholipide (EPL) bei gleichzeitiger Gabe von Clofibrat auf die verschiedenen Lipoproteine geprüft.

EPL werden aus Sojabohnenöl gewonnen und enthalten 94 - 96 % Phosphatidylcholin. Dieses setzt sich aus 3,8 % Phosphor, 14,9 % Cholin und 69 % Fettsäuren zusammen. Die prozentuale Verteilung der Fettsäuren in den verschiedenen EPL-Molekülen ist: 4,4 % Stearin-, 5,7 % Linolen-, 10,5 % Öl-, 12,9 % Palmitin- und 66,5 % Linolsäure (23, S. 3-5).

EPL haben multiple Wirkungen auf Gewebs- und Plasmalipide, die in Zusammenhang mit der emulgierenden Wirkung von Phospholipiden und den spezifischen Fettsäurekonstellationen im EPL-Molekül gebracht worden sind: Man erzielt damit bei hoher Dosierung im Tierexperiment eine Senkung erhöhter Serumlipidspiegel mit besonderer Bevorzugung des freien und Gesamtcholesterins unter gleichzeitiger Erniedrigung der anderen verantwortlichen Parameter (z.B. Triglyceride). Weiterhin können sie atherosklerotische Veränderungen an der Aorta verhindern bzw. abbauen, was experimentell bewiesen wurde (30).

Da es denkbar erschien, daß EPL im Katabolismus von VLDL und der Interkonversion von VLDL zu LDL eine Wirkung entfalten könnten und sie in der verwandten, relativ niedrigen Dosierung allein keine signifikanten Veränderungen der Gesamtplasmalipide hervorrufen (27), erschien eine Kombination mit EPL erfolgversprechend, um den genannten ungünstigen Nebeneffekt einer LDL-Erhöhung unter Clofibrattherapie zu inhibieren.

2. METHODIK

2.1 Blutprobengewinnung

2.1.1. Patienten

Zur Blutabnahme wurden 80 Patienten der Stoffwechselambulanz der Medizinischen Poliklinik einbestellt, die an den Hyperlipoproteinämien-Typen IIa, IIb, IV und V nach FREDRICKSON erkrankt waren mit Gesamtcholesterinwerten ≥ 300 mg/100 ml und/oder Gesamttriglyceridwerten ≥ 200 mg/100 ml. (18)

Patienten mit ernstesten Leber- und Nierenerkrankungen sowie nicht vollkompensiertem Diabetes waren ausgeschlossen.

Auch schwangere Personen waren im Patientengut nicht enthalten.

Von 80 Blutprobenserien waren 67 - bei den Phosphatiden 63 - verwertbar, die von 34 männlichen und 33 weiblichen Patienten im Alter von 30 - 79 Jahren (Mittelwert $57,2 \pm 1,9$ Jahre) stammten.

2.1.2. Versuchsbedingungen

Die Patienten wurden von den betreuenden Ärzten über den Sinn und Ablauf des Versuches informiert. Sie erschienen viermal im Abstand von jeweils 4 Wochen nüchtern zur morgendlichen Blutentnahme. Die Blutproben wurden aus der leicht gestauten Armvene entnommen und in heparinisierte Zentrifugenröhrchen aufgefangen.

2.1.3. Dosierung

Die Patienten erhielten jeweils 4 Wochen lang Clofibrat (1,2 g pro die auf 3 Portionen verteilt), Clofibrat - EPL (1,8 g pro die in 3 Raten) und zweimal ein Placebo.

Es handelte sich hierbei um einen Doppelblindversuch, bei dem Medikamenten- und Placebophasen zufallsverteilt abwechselten und die verordnenden Ärzte wie die Patienten nicht wußten, um welche Kapseln es sich jeweils handelte.

2.2. Blutprobenverarbeitung

2.2.1. Plasmagewinnung und -lagerung

Das venös entnommene Blut wurde unverzüglich bei 4000 U/min 15 min lang zentrifugiert und anschließend das Plasma vom Blutkuchen abgetrennt. 6 ml Plasma wurden zur präparativen Ultrazentrifugation (siehe Kapitel 2.3.) verwendet und das restliche Plasma auf je 3 Portionen für die Bestimmung der Gesamtphosphatide, -triglyceride und des Gesamtcholesterins verteilt. Dieses wurde unverzüglich eingefroren, ebenso wie die nach Ultrazentrifugation gewonnenen Fraktionen (VLDL, LDL, HDL).

2.2.2. Plasmaverarbeitung

Der Arbeitsgang wurde in folgender Reihenfolge durchgeführt:

1. Präparative Ultrazentrifugation
2. Phosphatidbestimmung
3. Triglyceridbestimmung
4. Gesamtcholesterinbestimmung.

2.3. Präparative Ultrazentrifugation

Zur Trennung des Plasmas in die einzelnen Lipoproteinfraktionen benutzen wir die Methode nach HAVEL, EDER und BRAGDON (20) unter Berücksichtigung eigener Erfahrungen.

Prinzip

Das Plasmalipoproteinspektrum umfaßt einen Dichtebereich von $\rho = 0,92 - 1,21 \text{ g/ml}$, im Gegensatz zu den Lipiden, die sich über den Bereich von $\rho = 0,88 - 0,90 \text{ g/ml}$ erstrecken und den Proteinen, die von $\rho = 1,30 - 1,35 \text{ g/ml}$ zu finden sind. Bei der präparativen Ultrazentrifugation nehmen die Lipoproteine in dem angegebenen Dichtebereich aber kein kontinuierliches Spektrum ein, sondern bilden gewisse Konzentrationsmaxima und -minima. Durch die Wahl eines geeigneten Lösungsmittels mit entsprechender Dichte lassen sich die Lipoproteine teils zum Flotieren, teils zum Sedimentieren bringen. Auf diese Weise können die Plasmalipoproteine in prinzipiell 3 Fraktionen getrennt werden, indem das Plasma wiederholt zentrifugiert und dabei die Lösungsmitteldichte durch die Zugabe einer Stammsalzlösung konstanter Dichte fortlaufend erhöht wird. Dazu verwendeten wir eine konzentrierte Salzlösung der Massendichte $\rho = 1,346 \text{ g/ml}$.

Die gewünschte Dichte d_G der Mischung errechnet sich wie folgt:

$$A \times d_{VL} + B \times 1,346 = (A + B) \times d_G$$

A = Volumen der vorliegenden Lösung

B = Volumen der erforderlichen konzentrierten
Stammsalzlösung

d_{VL} = Dichte der vorliegenden Lösung.

Aus dieser Gleichung ergibt sich für B :

$$B = A \times \frac{d_G - d_{VL}}{1,346 - d_G} \quad (F_1)$$

Durch Zugabe einer berechneten Menge Aqua bidest. zu einem Teil der Stammlösung stellten wir nach F_1 zwei weitere Kochsalzlösungen der Dichten 1,063 g/ml und 1,21 g/ml her. Damit füllten wir entsprechende zu geringe Serummengen isotonisch auf.

Chemikalien

NaCl reinst

KBr reinst

Stammlösung

Zur Herstellung wurden 153,0 g NaCl und 354,0 g KBr mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt. Diese Lösung der Dichte $\rho = 1,346$ g/ml wurde fest verschlossen aufbewahrt, um eine Dichteänderung durch Verdunsten zu verhindern.

Apparatur

Ultrazentrifuge: BECKMANN, Modell L5-50

Rotor: BECKMANN, Typ 40.3

Zentrifugenröhrchen: BECKMANN, Cellulose Nitrate Tubes
No. 302232, Size 1/2" dia x 2 1/2"

Verschlußkappen: BECKMANN

Röhrchenschneidevorrichtung: RANDOLPH & RYAN, Nr. 210

Durchführung

Wie BEHRENS (5), modifiziert nach eigenen Erfahrungen, trennten wir die flotierte Oberflächenschicht mit einer Röhrchenschneidevorrichtung von der Bodenfrak-

tion ab. Die Schnittebene lag dabei in einer klaren, farblosen, eiweiß- und lipoproteinfreien Zone. Zur Gewinnung der einzelnen Lipoproteinfraktionen wurde ein Zentrifugenröhrchen mit 6 ml Plasma gefüllt. Diese Menge reichte auf Grund unserer Vorversuche für die Bestimmung aus; außerdem war eine genügend breite lipoproteinarme Zone gegeben, in der ein Abtrennen der Spitzenfraktion ohne Vermischen möglich war.

Vor Beginn eines jeden Laufes wurde die Ultrazentrifuge gemeinsam mit dem Rotor auf $+ 12^{\circ}\text{C}$ vortemperierte. Diese Temperatur wurde bis zum Ende eines 22-stündigen Zentrifugenlaufes bei ca. 36000 U/min beibehalten. Diese Umdrehungszahl entspricht einem RCF-Wert⁺ von 105000 g

$$\begin{aligned} + \text{ RCF} &= \text{Relative Centrifugal Force} \\ &= \frac{\text{Zentrifugalkraft}}{\text{Gravitationskraft}} = \frac{\omega \times r}{g} = 1,119 \times 10^{-3} \times r \\ &\quad \times (\text{rpm})^2 \end{aligned}$$

r = Radius des Rotors in Meter

rpm = U / min

1. Gewinnung der VLDL-Fraktion

Anfangs pipettierten wir 6 ml Plasma in ein Zentrifugenröhrchen, das fest verschlossen in den Rotor eingeführt wurde. Nach Einsetzen des Rotors in die Ultrazentrifuge lief diese 22 Stunden bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 36000 U/min.

Da das Plasma eine Dichte von 1.006 g/ml besitzt, floßten innerhalb dieses Zeitraumes alle Lipoproteine der Dichte $\rho \leq 1,006 \text{ g/ml}$, d.h. die Gruppe der VLDL quantitativ zur Oberfläche, während die Lipoproteine der Dichte $\rho \geq 1,006 \text{ g/ml}$ sedimentierten und sich in der Bodenfraktion anreicherten.

Nach Auslaufen der Ultrazentrifuge wurden die Proben dem Rotor entnommen und mit der Schneidevorrichtung durchtrennt. Der Abstand der Schnittebene vom Boden der Verschlusskappe wurde der jeweiligen Breite der Flotationsschicht entsprechend gewählt.

Dieses war nach unseren Erfahrungen günstiger als die Methode von BEHRENS (5), weil die VLDL - Schicht je nach Lipoproteingehalt im vorliegenden Plasma in der Breite variierte. Außerdem war ein konstantes Einstellen des Schneidegerätes nicht erforderlich, weil die Spitzenfraktion in ein vorher abgewogenes Einmalreagenzglas pipettiert, anschließend nochmals gewogen und die Menge in g durch Umrechnen in ml nach der Formel

$$V = \frac{m}{\varrho} \quad \text{bestimmt wurde.} \quad (F_2)$$

V = Volumen der Spitzenfraktion in ml

m = Masse in g

ϱ = Massendichte in g/ml.

2. Gewinnung der LDL-Fraktion

Nach Abtrennen der Spitzenfraktion wurde der restliche Röhrcheninhalt in ein vorher abgewogenes Zentrifugenröhrchen pipettiert, anschließend gewogen und das Volumen nach F_2 bestimmt. Die präparative Ultrazentrifugation zur Gewinnung der LDL-Fraktion wurde bei einer Lösungsmitteldichte von $\varrho = 1,063$ g/ml durchgeführt. Diese Dichte erreichten wir durch Hinzupipettieren einer bestimmten nach F_1 berechneten Stammlösung ($\varrho = 1,346$ g/ml). Mit isotoner Salzlösung füllten wir das Zentrifugenröhrchen bis zu 6 ml Inhalt auf.

Das weitere Verfahren wurde analog der ersten Fraktionierung vorgenommen.

3. Gewinnung der HDL-Fraktion

Die präparative Ultrazentrifugation zum Abtrennen der HDL-Schicht wurde bei einer Lösungsmitteldichte von $\rho = 1,21$ g/ml durchgeführt.

Das weitere Verfahren wurde analog der ersten Fraktionierung vorgenommen.

Bei den auf die Ultrazentrifugation folgenden Bestimmungen der Fraktionen der VLDL, LDL und HDL war bei der Berechnung zu beachten:

Da in das entsprechende Volumen von Yml (je nach Abstand der Schnittebene vom Boden der Verschlusskappe verschieden) die jeweils gewünschten Lipoproteine flotiert waren, die ursprünglich in 6 ml vorlagen, wurden diese auf das 6/Y-fache der Ausgangskonzentration angereichert.

Daher mußten wir die Resultate der Cholesterin-, Triglycerid- und Phosphatidbestimmungen korrigieren, indem wir sie durch diesen Wert dividierten.

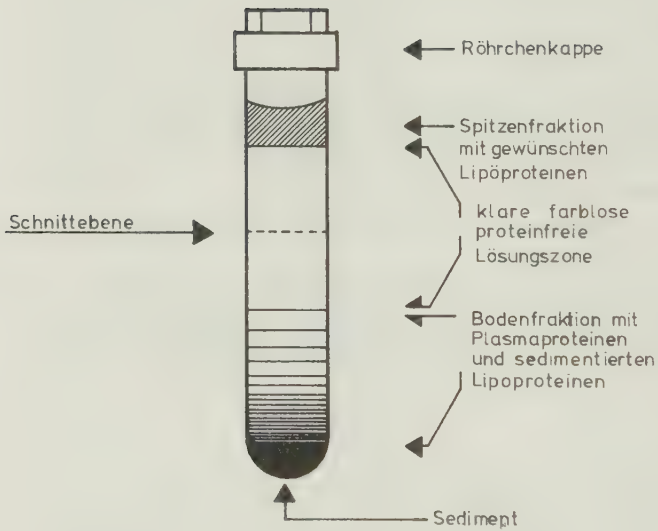


Abb. 1 : Verteilung der Plasmakomponenten in einem Zentrifugenröhrchen nach einem präparativen Ultrazentrifugenlauf.

PLASMA

$d = 1,006 \text{ g/ml}$

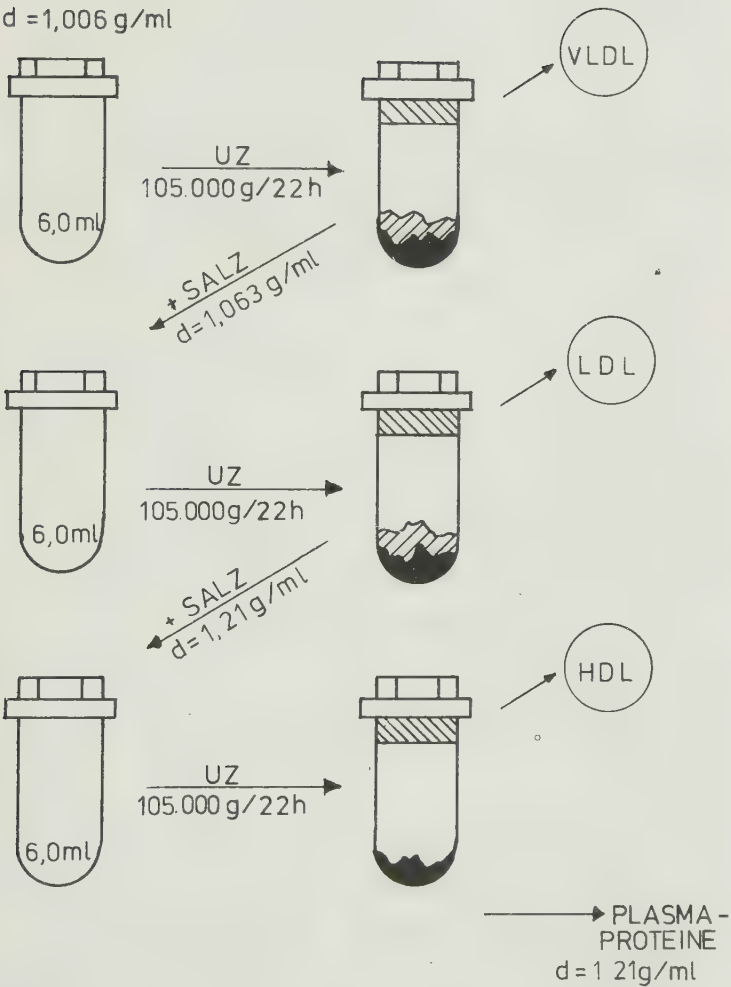


Abb. 2 : Isolierung der Plasmalipoproteinfractionen mit Hilfe der präparativen Ultrazentrifuge (UZ).

2.4 Bestimmung der Phosphatide

Die Bestimmung der Phosphatide erfolgte über die Phosphoranalyse nach BARTLETT (4); die Veraschung wurde nach ALLEN (3) und die Extraktion der Lipide nach der Methode von FOLCH (17) durchgeführt.

Prinzip

Nach der Bestimmung des Lipidphosphors im FOLCH-Extrakt durch Veraschung und anschließender Entwicklung von Phosphormolybdänblau berechneten wir den Phosphatidgehalt über die Extinktion im ZEISS-Spektralphotometer.

Chemikalien

Chloroform DAB 6

Methanol p.a.

Natriumchlorid p.a.

Perchlorsäure (70%ig) p.a.

Ammoniummolybdat p.a.

Natriumsulfit p.a.

1-Amino-2-naphtol-4-sulfonsäure p.a.

Natriumpyrosulfit p.a.

Konzentrierte Schwefelsäure p.a.

Kaliumdihydrogenphosphat p.a.

Reagentien

Ammoniummolybdat 0,22 %-ig (1,1 g ad 500 ml Aqua bidest.)

Reduktionsreagenz nach FISKE und SUBBA ROW (16):

Zu 200 ml frischangesetzter 13,7 %-iger Natriumpyrosulfitlösung wurden 0,5 g 1-Amino-2-naphtol-4-sulfonsäure und 2 g wasserfreies Natriumsulfit unter Umrüh-

ren gegeben. Die Lösung wurde filtriert, in einer dunklen Flasche aufbewahrt und alle zwei Wochen erneuert.

Anorganischer Phosphorstandard

0,3509 g des vorgetrockneten Kaliumdihydrogenphosphates wurde in einem 1-Liter-Meßkolben gelöst, 10 ml 10N Schwefelsäure zugegeben und mit Aqua bidest. auf einen Liter aufgefüllt. Diese Stammlösung enthält in 5 ml 0,4 mg Phosphor und ist unbegrenzt haltbar.

Durchführung

Die Analyse wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. Zur Extraktion der Lipide wurden 0,5 ml Plasma und 16 ml Chloroform mit Methanol auf 25 ml aufgefüllt, geschüttelt und filtriert. Zur besseren Trennbarkeit wurden 20 ml des Filtrates in einen Schütteltrichter gegeben und mit 40 ml gesättigter Kochsalzlösung versetzt. Nach kräftigem Schütteln ließen wir die Lösung für 30 min zum Absetzen der Chloroformphase stehen und filtrierten diese anschließend in ein Schliffgläschen.

Anorganisches Phosphat des Plasmas bleibt in der Salzwasser-Methanolphase zurück. Der aus den Phosphatiden stammende Phosphor befindet sich in der Chloroformphase.

Anschließend wurden jeweils 0,5 ml des Filtrates bei 70°C für 5 - 10 min eingedampft. Danach wurde in jedes Glas 0,4 ml 70%-iger Perchlorsäure pipettiert, entsprechend auch in ein weiteres Reagenzglas zur Ermittlung des Leerwertes. Die Proben und der Leerwert wurden dann im Sandbad bei 180°C eine Stunde lang verascht. Nach dem Erkalten erfolgte die Zugabe von 4,6 ml einer 0,22%-igen Ammoniummolybdatlösung und

von 0,2 ml Reduktionsreagenz. Nach gutem Schütteln wurden die Reagenzgläser für 7 min in ein kochendes Wasserbad gestellt, anschließend abgekühlt und die Extinktionen der Proben gegen den Leerwert im ZEISS-Spektralphotometer bei 830 nm und einer Schichtdicke der Quarzküvetten von 1 cm bestimmt.

In jeder Serie wurde ein Standardwert mitgeführt. Die Standardlösung (2,5 ml) wurde auf 50 ml mit Aqua bidest. verdünnt. 0,5 ml dieser Verdünnung gingen als "Tagesphosphorstandard" entsprechend der Probe in den Arbeitsgang ein.

Berechnung

Nach dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz gilt:

$$\frac{C_P}{C_{St}} = \frac{E_P}{E_{St}} \quad (F_3)$$

C_P = Konzentration der Probe

C_{St} = Konzentration des Standards

E_P = Extinktion der Probe

E_{St} = Extinktion des Standards

Daraus folgt:

$$C_P = \frac{E_P \times C_{St}}{E_{St}} \quad (F_4)$$

Wegen der Verdünnung der Serumproben bei der Extraktion gegenüber dem nicht extrahierten Standard gilt:

$$\text{Phosphor/ml Serum} = \frac{E_P}{E_{St}} \times 4 \times 32 \quad (F_5)$$

In mg/100 ml ausgedrückt:

$$\frac{\text{Phosphor in mg}}{100 \text{ ml}} = \frac{E_P}{E_{St}} \times 4 \times 32 \times 0,1 \quad (F_6)$$

Der Gehalt an Phosphatiden als Lecithin errechnet sich aus dem Phosphorgehalt multipliziert mit 25 :

$$\frac{\text{Phosphatide (als Lecithin) in mg}}{100 \text{ ml}} = \frac{E_P}{E_{St}} \times 25 \times 4 \times 32 \times 0,1 \quad (F_7)$$

Daraus resultiert:

$$C_{Ph} = \frac{E_P}{E_{St}} \times 320 \quad \left[\text{mg} / 100 \text{ ml} \right] \quad (F_8)$$

Kritik

Der Nachweis ist sehr empfindlich. Verunreinigungen durch Spülmittelrückstände oder schlecht destilliertes Wasser verfälschen die Meßwerte.

Fehlerbreite

Bei 10 Parallelbestimmungen ergab sich ein Mittelwert von 247,1 mg/100 ml, die Standardabweichung S_E betrug $\pm 8,13$ mg/100 ml, was einer relativen Standardabweichung von 3,29 % entsprach.

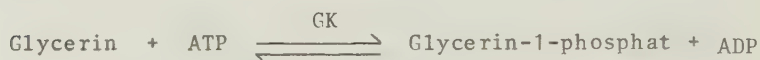
2.5 Bestimmung der Triglyceride

Die Bestimmung der Triglyceride erfolgte nach der Methode von EGGSTEIN und KREUTZ (12, 13), modifiziert nach SCHMIDT und VAN DAHL (26)

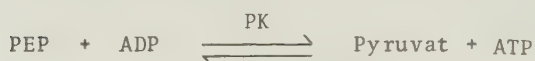
Prinzip

Die Triglyceride wurden enzymatisch über ihren Glycerin-gehalt bestimmt. Dabei wurde das nach der Verseifung

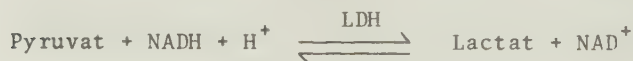
der Fette entstandene Glycerin in der durch das Enzym Glycerokinase (GK) katalysierten Reaktion durch Adenosin-5'-triphosphat (ATP) zu Glycerin-1-phosphat phosphoryliert.



Mit Hilfe der Pyruvat-Kinase (PK) wird das entstandene Adenosin-5'-diphosphat (ADP) durch Phosphoenol-pyruvat (PEP) unter Bildung von Pyruvat wieder in ATP überführt.



Pyruvat wird durch reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) mittels Lactat-Dehydrogenase (LDH) zu Lactat hydriert, wobei NADH zu Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD^+) oxidiert wird.



Die während der Reaktion verbrauchte NADH - Menge ist der Glycerin-Menge äquivalent. NADH kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 366 nm auf Grund seiner Lichtabsorption gemessen werden.

Für die quantitative Analyse wurde die von der Firma BOEHRINGER entwickelte Biochemica-Test-Combination "Neutralfett und Glycerin" verwendet.

Chemikalien

Äthanolische Kalilauge, ca. 0,5 N

Magnesiumsulfatlösung, ca. 0,15 M

Reagentien

Lösung I : 0,1 M Triäthanolaminpuffer, pH 7,6
 4 mM Magnesiumsulfat

Lösung II: 6 mM NADH
 33 mM ATP
 11 mM PEP

Lösung III: LDH $\geq$ 800 U/ml
 PK $\geq$ 130 U/ml

Lösung IV: GK $\geq$ 150 U/ml

Durchführung

In ein Zentrifugenglas wurden jeweils 0,2 ml Plasma und 0,5 ml äthanolische Kalilauge pipettiert und gut durchgemischt. Nach dem Verschuß des Glases mit "Parafilm" wurde in einem 70°C heißen Wasserbad 30 min lang inkubiert und anschließend auf Zimmertemperatur abgekühlt. Danach wurde jeweils 1 ml Magnesiumsulfatlösung hinzugegeben, kräftig gemischt und 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert.

In eine Küvette (1 cm Schichtdicke) pipettierten wir 0,5 ml des klaren Überstandes und ein Reaktionsgemisch, bestehend aus 2,5 ml Lösung I, 0,1 ml Lösung II und 0,02 ml Lösung III. Nach Durchrühren mit einem Plastikspatel blieb das Gemisch 10 min bei Raumtemperatur stehen. Anschließend wurde die Extinktion E_1 bei einer Wellenlänge von 366 nm im Photometer nach EPPENDORF gemessen. Danach fügten wir 0,02 ml der Lösung IV dem Küvetteninhalt hinzu, mischten wieder und bestimmten nach 10 min die Extinktion E_2 gegen den Leerwert Luft.

Aus der Extinktion E_1 und E_2 erhielten wir durch Subtraktion die Extinktionsdifferenz ΔE_{Probe} :

$$\Delta E_p = E_1 - E_2$$

Berechnung der Substratkonzentration

Allgemein gilt die Formel:

$$c = \frac{MG}{\epsilon \cdot d \cdot 10} \times \frac{V}{v} \times F \times \Delta E \quad \left[\text{mg} / 100 \text{ ml} \right] \quad (F_9)$$

$$\epsilon = \text{Extinktionskoeffizient von NADH bei 366 nm} \\ = 3,3 \text{ cm}^2 / \mu\text{Mol}$$

$$d = \text{Schichtdicke der Kuvette} \hat{=} 1 \text{ cm}$$

$$V = \text{Volumen der in die Kuvette einpipettierten} \\ \text{Lösungsmenge} \hat{=} 1,27 \text{ ml}$$

$$v = \text{Volumen des eingesetzten Überstandes der Versei-} \\ \text{fungsreaktion} \hat{=} 0,2 \text{ ml}$$

$$F = \text{Verdünnungsfaktor} \hat{=} 81,69$$

$$\Delta E = E_1 - E_2$$

Zu berücksichtigen ist noch der Durchschnittsgehalt des Plasmas an freiem Glycerin mit 1,0 mg/100 ml, was nach den Molekulargewichten (Quotient aus den mittleren Molekulargewichten der Triglyceride - 885 - und des Glycerins - 92,1 -) etwa 10 mg/100 ml Neutralfett entspricht.

So ergibt sich für die Konzentration c der Triglyceride im Plasma folgende Bestimmungsgleichung:

$$c = 1432 \times (\Delta E - 10) \quad \left[\text{mg}/100 \text{ ml} \right] \quad (F_{10})$$

Fehlerbreite

Bei 10 Parallelbestimmungen ergab sich ein Mittelwert von 192,7 mg/100 ml, die Standardabweichung S_E betrug $\pm 3,84$ mg/100 ml, was einer relativen Standardabweichung S_R von 1,99 % entsprach.

2.6 Bestimmung des Gesamtcholesterins

Die Bestimmung des Gesamtcholesterins wurde nach der Methode von WATSON (31), in der Modifikation von RICHTERICH und LAUBER (24) durchgeführt.

Prinzip

Der Nachweis beruht auf der Farbreaktion nach LIEBERMANN und BURCHARDT (7).

Sterine ergeben in wasserfreiem Milieu mit Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure durch die Bildung polymerer Kohlenwasserstoffe eine blau-grüne Färbung, deren Intensität der Cholesterinkonzentration proportional ist und photometrisch gemessen werden kann. Statt einer vollständigen Eiweißfällung erfolgt bei der Zugabe von methylierten Benzolsulfonsäuren teils eine Dispersion, teils eine Präzipitation.

Für die quantitative Analyse wurde die von der Firma BOEHRINGER entwickelte Biochemica-Test-Combination "Cholesterin" verwendet.

Chemikalien

Eisessig p.a.

Cholesterin reinst

Essigsäureanhydrid p.a.

Konzentrierte Schwefelsäure p.a.

2,5 - Dimethyl - Benzolsulfonsäure p.a.

Reagentien

Lösung I : 200 mg Cholesterin/100 ml Eisessig

Lösung II: 0,05 mM Dimethylbenzolsulfonsäure

7,0 M Essigsäure

6,5 M Essigsäureanhydrid

Durchführung

Die Analyse wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. In trockene Reagenzgläser wurden 0,1 ml Plasma bzw. 0,1 ml der Lösung I (Cholesterinstandard) bzw. 0,1 ml Aqua bidest. (Leerwert) pipettiert. Dazu gaben wir 2,5 ml der Lösung II, mischten gut durch und stellten die Analysenröhrchen für 5 min in ein Wasserbad von 25°C. Anschließend fügten wir 0,5 ml konzentrierte Schwefelsäure hinzu, schüttelten kräftig durch und stellten ihn wiederum in das 25°C warme Wasserbad. Danach füllten wir die Lösung in Küvetten der Schichtdicke 1 cm um und bestimmten bei einer Wellenlänge von 578 nm die Extinktion der Proben und des Standards gegen die des Leerwertes im Photometer nach EPPENDORF.

Berechnung

Nach dem LAMBERT - BEER'schen Gesetz gilt aus den Formeln F_3 und F_4 folgendes:

$$\frac{\text{Cholesterin in mg}}{100 \text{ ml}} = \frac{E_P}{E_{St}} \times 200 \quad (F_{11})$$

wobei 200 auf Grund der Konzentration des Cholesterins im Standard als Faktor in die Rechnung eingeht.

Kritik

Bei der hier durchgeführten Methode werden die sonst übliche Extraktion und Enteiweißung umgangen. Dadurch verringert sich die Anzahl der Arbeitsschritte und folglich die Fehlerbreite.

Hämolytische und ikterische Seren verfälschen die Ergebnisse.

Außerdem ist die Wahl der Wellenlänge hierbei problematisch, da wegen der Farbstabilität die Ablesung unter 580 nm erfolgen muß, während das Maximum im Absorptionsspektrum bei über 600 nm liegt.

Fehlerbreite

Bei 10 Parallelbestimmungen ergab sich ein Mittelwert von 271,4 mg/100 ml, die Standardabweichung S_E betrug $\pm 6,59$ mg/100 ml, was einer relativen Standardabweichung S_R von 2,43 % entsprach.

3. STATISTIK

Die Mittelwertberechnung erfolgte nach der Formel:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (F_{12})$$

$$\sum_{i=1}^n x_i = \text{Summe aller Einzelwerte}$$

n = Anzahl der durchgeführten Versuche

Die Standardabweichung, d.h. die Streuung der Einzelwerte wurde bestimmt aus:

$$S_E = \pm \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}} \quad (F_{13})$$

Die relative Standardabweichung errechnete sich wie folgt:

$$S_R = \pm \frac{S_E}{\bar{x}} \times 100 \% \quad (F_{14})$$

Die Streuung der Mittelwerte ergab sich aus:

$$S_M = \frac{S_E}{\sqrt{n}} \quad (F_{15})$$

Zum Vergleich der Veränderungen vor und nach der Therapie wurde der Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben bei nicht symmetrischer Verteilung angewandt. Damit die beiden Therapiegruppen gegenübergestellt werden konnten, wurde mit dem Wilcoxon-Test für verteilungsfreie Paardifferenzen statistisch ausgewertet (28).

4. ERGEBNISSE

In der Tabelle I sind die Wirkungen der Kombination EPL + Clofibrat auf das Gesamtcholesterin (CH), die Gesamttriglyceride (TG) und die Gesamtphospholipide (PL) im Plasma zusammengefaßt.

Die Gesamtcholesterinwerte wurden bei der Kombinationstherapie signifikant gesenkt ($2p < 0,01$), während bei alleiniger Clofibratbehandlung nur ein Trend ($2p < 0,1$) erreicht wurde (6).

Die Triglyceridwerte wurden mit hoher statistischer Signifikanz gesenkt ($2p < 0,001$), ebenso die Phospholipide ($2p < 0,05$).

Tabelle II zeigt die prozentuale Verteilung des Gesamtcholesterins, der -triglyceride und der -phospholipide im Plasma auf die bei der präparativen Ultrazentrifugation gewonnenen Fraktionen (VLDL, LDL und HDL).

Die prozentuale Erhöhung des LDL-Cholesterins, die nach der Behandlung mit EPL + Clofibrat gefunden wurde, war wesentlich niedriger ($2p < 0,05$) als diejenige Erhöhung, die nach alleiniger Clofibrattherapie auftrat ($2p < 0,001$).

Ähnliche Veränderungen zeigten sich auch bei den Phospholipiden, aber im Gegensatz zum Cholesterin war hier, bezogen auf die Differenz zwischen den Wirkungen der beiden Medikamente, nur ein statistischer Trend ($2p < 0,1$) zu erkennen.

Fast identische, unbedeutende Veränderungen wurden in beiden Therapiegruppen bei den Triglyceriden gefunden.

Tabelle III zeigt die absoluten Werte des Gesamtcholesterins und des Cholesterins in den einzelnen Fraktionen (VLDL, LDL und HDL).

Zu sehen war ein deutliches absolutes Anwachsen der LDL-Cholesterinwerte nach der Behandlung mit Clofibrat (6), aber nach der Kombinationstherapie mit EPL + Clofibrat erhielten wir einen sehr schwachen Abfall der LDL-Cholesterinwerte.

Die Veränderungen waren hierbei nicht signifikant, da die Streuung der Absolutwerte sehr groß war.

Während des gesamten Versuches änderte sich das durchschnittliche Körpergewicht nicht. Die Mittelwerte und die Standardabweichung betrugen nach jeder der vier Phasen 75,3, 75,9, 75,8 und $75,2 \pm 1,4$ kg.

Die Schwankungen des individuellen Körpergewichtes bewegten sich in derselben Größenordnung.

TABELLEN

- Tabelle I : Gesamtcholesterin, -triglyceride und -phosphatide im Serum vor und nach den Behandlungsperioden
- Tabelle II : Aufstellung der VLDL-, LDL- und HDL-Fraktionen vor und nach den Behandlungsperioden
- Tabelle III : Absolute Gesamtcholesterinwerte in Gesamtserum, VLDL, LDL und HDL vor und nach den Behandlungsperioden

Zeichenerklärung:

- CH = Cholesterin
- TG = Triglyceride
- PL = Phospholipide
- $\bar{x}$ = Mittelwert (n = 67)
- S_E = Standardabweichung (n = 67)
- Tr. = Trend
- n.s. = nicht signifikant
- + = Signifikanz auf 5 % Niveau
- ++ = Signifikanz auf 1 % Niveau
- +++ = Signifikanz auf 0,1 % Niveau

mg / 100 ml		EPL + Clofibrat 1,8 g/d 1,2 g/d		
		vorher	nachher	Diff.
CH	$\bar{x}$ S_E	241,0 + 8,2 —	221,0 + 6,2 —	- 20,0 + 5,8 — ++
TG	$\bar{x}$ S_E	391,0 + 45,9 —	333,0 + 57,4 —	- 58,0 + 33,7 — +++
PL ⁺⁾	$\bar{x}$ S_E	280,0 + 12,2 —	258,0 + 10,9 —	- 22,0 + 8,6 — +

Tabelle I: Gesamtcholesterin, -triglyceride und -phospholipide im Serum vor und nach den Behandlungsperioden

+) n = 63

In %		EPL + Clofibrat 1,8 g/d			Clofibrat 1,2 g/d						
		vorher	nachher	Diff.	vorher	nachher	Diff.				
CH	VLDL	27,4	23,0	- 4,4	+	29,1	19,8	- 9,3	+++	- 4,9	+
		$\pm 2,3$	$\pm 2,2$	$\pm 2,1$		$\pm 2,6$	$\pm 1,6$	$\pm 2,0$			
	LDL	51,4	55,2	3,8	+	49,1	57,7	8,6	+++	4,8	+
		$\pm 2,1$	$\pm 2,1$	$\pm 1,8$		$\pm 2,2$	$\pm 1,7$	$\pm 2,0$			
	HDL	21,0	21,7	0,7	n.s.	21,4	22,4	1,0	n.s.	0,3	n.s.
		$\pm 1,0$	$\pm 1,2$	$\pm 1,0$		$\pm 1,1$	$\pm 1,3$				
TG	VLDL	60,2	58,1	- 1,9	n.s.	60,3	58,4	- 1,9	n.s.	0	n.s.
		$\pm 1,8$	$\pm 1,8$	$\pm 1,4$		$\pm 2,0$	$\pm 1,7$	$\pm 1,3$			
	LDL	19,4	22,2	2,5	++	19,9	22,6	2,7	++	- 0,1	n.s.
		$\pm 1,0$	$\pm 1,0$	$\pm 1,0$		$\pm 1,3$	$\pm 1,1$	$\pm 1,1$			
	HDL	20,3	19,6	- 0,7	n.s.	19,7	19,0	- 0,7	n.s.	0	n.s.
		$\pm 1,2$	$\pm 1,0$	$\pm 1,1$		$\pm 1,2$	$\pm 0,9$	$\pm 0,9$			
PL*)	VLDL	27,0	22,6	- 4,4	+	27,0	20,3	- 6,7	++	- 2,3	n.s.
		$\pm 2,4$	$\pm 2,2$	$\pm 2,0$		$\pm 2,4$	$\pm 1,6$	$\pm 1,9$			
	LDL	39,6	42,3	2,7	n.s.	38,1	45,3	7,2	+++	4,5	Tr.
		$\pm 1,9$	$\pm 1,9$	$\pm 1,6$		$\pm 2,0$	$\pm 1,5$	$\pm 1,7$			
	HDL	33,4	35,2	1,8	n.s.	34,9	34,4	- 0,5	n.s.	2,3	n.s.
		$\pm 1,3$	$\pm 1,4$	$\pm 1,3$		$\pm 1,6$	$\pm 1,2$	$\pm 1,3$			

*) n = 63

Tabelle II: Aufstellung der VLDL-, LDL- und HDL-Fraktionen vor und nach den Behandlungsperioden.

mg / 100 ml		EPL + Clofibrat 1,8 g/d			Clofibrat 1,2 g/d		
		vorher	nachher	Diff.	vorher	nachher	Diff.
Gesamt	$\bar{x}$	241,0	221,0	- 20,0	++	241,0	- 15,0
	S_E	$\pm 8,2$	$\pm 6,2$	$\pm 5,8$		$\pm 9,4$	$\pm 8,3$
VLDL	$\bar{x}$	67,3	50,9	- 16,4	++	69,9	- 26,5
	S_E	$\pm 7,0$	$\pm 5,9$	$\pm 6,3$		$\pm 8,3$	$\pm 7,4$
LDL	$\bar{x}$	123,4	122,9	- 0,6	n.s.	119,4	13,3
	S_E	$\pm 6,8$	$\pm 6,6$	$\pm 4,8$		$\pm 8,3$	$\pm 6,2$
HDL	$\bar{x}$	50,2	47,0	- 3,2	n.s.	50,3	- 0,9
	S_E	$\pm 3,1$	$\pm 2,5$	$\pm 2,9$		$\pm 3,3$	$\pm 3,7$
							n.s.

Tabelle III: Absolute Gesamtcholesterinwerte im Gesamtserum, VLDL, LDL und HDL vor und nach den Behandlungsperioden

Graphische Darstellungen

- I Vergleich der absoluten Cholesterinkonzentrationen der VLDL, LDL, HDL und ihrer Standardabweichungen vor und nach der Therapie mit Clofibrat und EPL bei den Fredrickson-Typen IIa, IIb, IV und V (n=67). Darstellung 1
- II Prozentuale Differenzen und Standardabweichungen der Cholesterin-, Triglycerid- und Phospholipidwerte in VLDL, LDL und HDL vor und nach der Therapie mit Clofibrat und EPL, aufgeteilt auf die verschiedenen Hyperlipoproteinämietypen.

Darstellung 2 : Fredrickson Typen IIa, IIb, IV, V
(n = 67)

Darstellung 3 : Fredrickson Typ II (n = 19)

Darstellung 4 : Fredrickson Typ IV (n = 37)

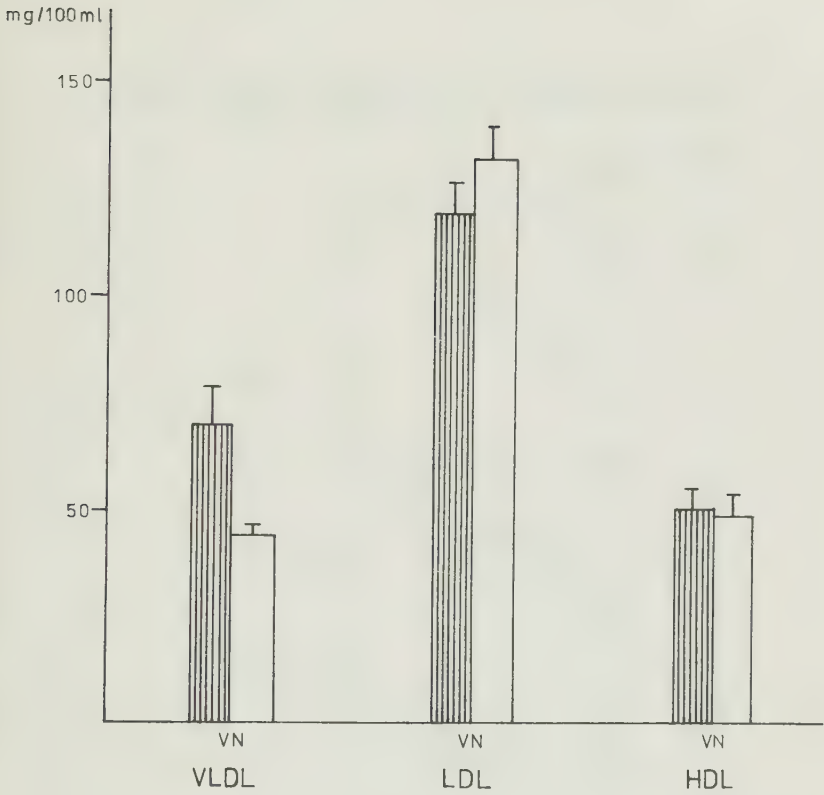
Zeichenerklärung:

T = Standardabweichung

V = vor Therapie

N = nach Therapie

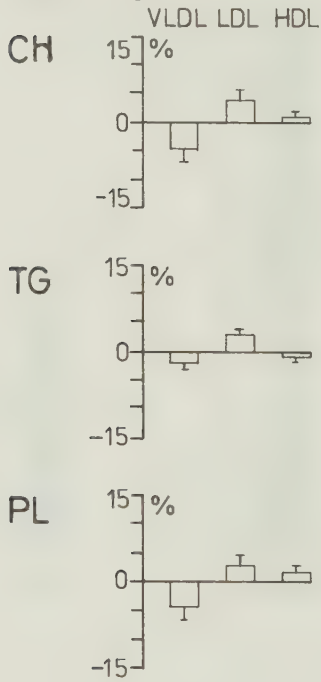
CH



Darstellung 1

Fredrickson - Typ IIa, IIb, IV, V, (n = 67)

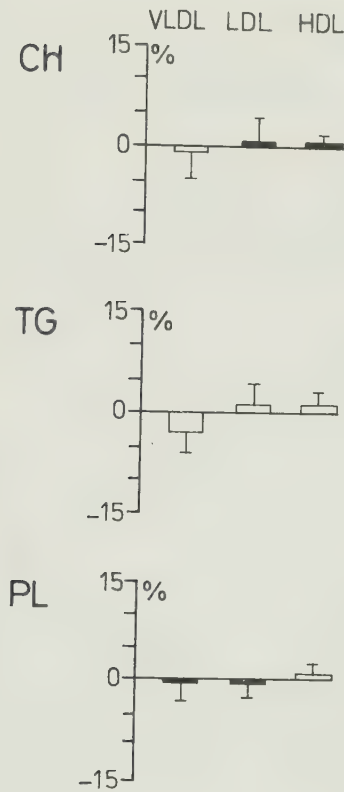
EPL-Clofibrat
1.8g/d 1.2g/d



Darstellung 2

Fredrickson-Typ II (n=19)

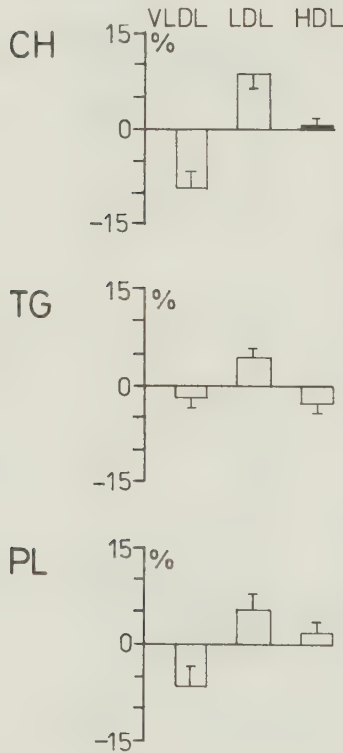
EPL + Clofibrat
1.8g/d 1.2g/d



Darstellung 3

Fredrickson - Typ IV(n=37)

EPL+ Clofibrat
1.8g/d 1.2g/d



Darstellung 4

5. DISKUSSION

Das augenfälligste Ergebnis einer Kombination von Clofibrat und essentieller Phospholipide gegenüber einer Clofibratmonotherapie ist der deutlich geringere Triglyceridabfall bei Betrachtung der Gesamtwerte im Plasma (58 mg/100 ml gegenüber 149 mg/100 ml bei vergleichbaren Ausgangswerten).

Bei Betrachtung der Triglyceridverteilung auf die verschiedenen Lipoproteine ist im Vergleich zur Clofibrattherapie jedoch kein Unterschied festzustellen.

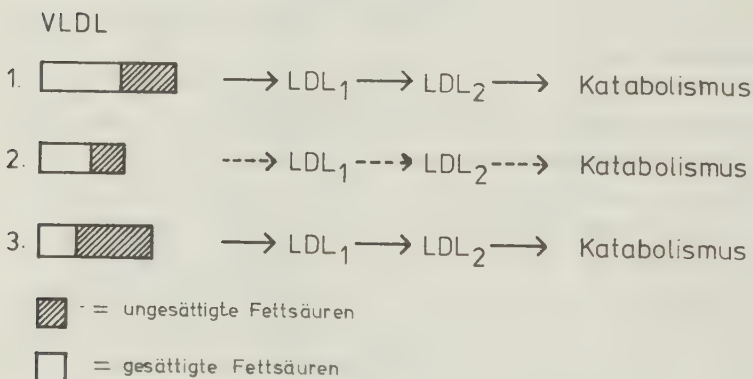
Daraus muß geschlossen werden, daß es sich unter Clofibrat und EPL-Behandlung bei einem Abfall der Gesamtriglyceride um ca. 15 %, bei einer relativen Abnahme in den VLDL um 1,9 % (nicht signifikant) und einer relativen Zunahme in den LDL um 2,8 % und den HDL um 0,7 % (nicht signifikant) um eine weitgehend uniforme Verminderung der Triglyceride handelt. Dies zeigt sich allerdings weniger deutlich als bei einer Clofibratmonotherapie (s. Tabelle II).

Die Unterschiede in der Verteilung des Cholesterins, die bei Clofibrat alleine gefunden werden, sind ebenfalls weniger deutlich ausgeprägt.

Wenn eine unterschiedliche Fettsäurezusammensetzung in den VLDL den weiteren Katabolismus beeinflußt und die Veränderungen der Gesamtriglyceride und bei proportionaler Verteilung damit auch in den verschiedenen Lipoproteindichteklassen bei der Kombinationsbehandlung nicht so prägnant sind, müssen auch die Auswirkungen auf den Katabolismus geringer sein. Das bedeutet, daß eine geringergradige Triglyceridsenkung in allen Lipoproteinen zu weniger einschneidenden Veränderungen im Fettsäuremuster der Triglyceride (s. Anhang 2) führt.

Wenn diese Ursache eine Katabolismushemmung wäre, sollte sie unter Kombinationstherapie weniger deutlich sein.

Modellvorstellung



Dargestellt ist die Verteilung der gesättigten und ungesättigten Fettsäuren in der VLDL-Fraktion bei den Typen IV und IIb (1.) bei Clofibratmonotherapie (2.) und bei einer Kombinationstherapie mit Clofibrat und EPL (3.) und die Umwandlung in LDL₁ und LDL₂. „Möglicherweise bewirkt Clofibrat eine Umverteilung im Fettsäuremuster, wodurch es den Abbau der VLDL hemmt. Die Kombination EPL + Clofibrat könnte nach diesem Modell dazu führen, daß zwar relativ mehr VLDL als unter Clofibrat alleine vorliegen, aber der Abbau verbessert ist.“

Diese bestechende Erklärungsmöglichkeit müßte durch entsprechende gaschromatographische Analysen gesichert werden. Bei ihrer Bestätigung könnte allerdings nur eine Studie über die Langzeitgefäßprognose von Hyperlipidämikern unter einer Kombinationstherapie Clofibrat-EPL zu entsprechenden Änderungen im derzeitigen therapeutischen Vorgehen Anlaß geben.

6. ZUSAMMENFASSUNG

80 hyperlipidämische Patienten der Medizinischen Poliklinik - 67 Blutprobenserien waren verwertbar, bei den Phospholipiden nur 63 - erhielten jeweils 4 Wochen lang Clofibrat (1,2 g/d), Clofibrat (1,2 g/d) und EPL (1,8 g/d) und 2mal ein Placebo.

Nach jeder Blutentnahme wurde das Plasma in der Ultrazentrifuge in die einzelnen Lipoproteinfractionen VLDL, LDL und HDL getrennt. In diesen Unterfraktionen sowie im Gesamtserum wurden jeweils Phospholipide, Triglyceride und Cholesterin bestimmt.

Das Ergebnis muß im Zusammenhang mit der Clofibratmonotherapie betrachtet werden (6).

Es zeigt sich, daß bei EPL + Clofibrat die Gesamttriglycerid- und die Gesamthospholipidwerte hoch-, die Gesamtcholesterinwerte einfach signifikant gesenkt wurden.

In den durch Ultrazentrifugation gewonnenen Fraktionen beobachteten wir bei Kombinationstherapie nur eine leichte Erhöhung des LDL-Cholesterins, während bei Clofibrat alleine eine hochsignifikante Zunahme gefunden wurde; die Senkung des VLDL-Cholesterins war hierbei ebenfalls nicht so deutlich ausgeprägt.

Ähnlich war auch das Ergebnis bei den Phospholipiden.

Dagegen war bei den Triglyceriden der Unterschied zwischen Mono- und Kombinationsbehandlung nicht signifikant.

Es wurde versucht, in einem Modell die unterschiedliche Wirkungsweise der beiden Therapiearten darzustellen: Während Clofibrat den Abbau der VLDL hemmt, dürfte EPL + Clofibrat den Katabolismus fördern.

Daraus ergibt sich, daß die Kombination EPL + Clofibrat möglicherweise in Zukunft eine wichtige Stellung bei der Behandlung und Prophylaxe von coronaren Herzerkrankungen einnehmen könnte.

7. ANHANG

1. Mittlere Plasma-Lipoproteinwerte von Stoffwechselgesunden in mg/100 ml (29) (Nach FREDRICKSON, 1972)

n	Alter	VLDL	LDL	HDL
143	0-19	12 $\pm$ 8	103 $\pm$ 27	52 $\pm$ 13
88	20-29	16 $\pm$ 10	112 $\pm$ 29	52 $\pm$ 12
67	30-39	17 $\pm$ 9	126 $\pm$ 33	51 $\pm$ 15
59	40-49	19 $\pm$ 11	134 $\pm$ 30	58 $\pm$ 16
24	50-59	25 $\pm$ 11	161 $\pm$ 30	45 $\pm$ 11

2. Fettsäuremuster (% der gesamten Fettsäuren) der Lipoproteinklassen einer Einzelperson (29) (Nach GOODMAN-SHIRTORI, 1964)

Fettsäure	VLDL	LDL	HDL
Triglyceride			
Ölsäure	28,8	25,0	24,2
Palmitinsäure	2,8	3,4	4,1
Linolsäure	44,6	44,4	40,4
Stearinsäure	14,1	14,3	13,6
Cholesterinester			
Linolsäure	48,2	52,1	52,5
Ölsäure	26,9	23,9	23,6
Palmitinsäure	13,6	12,0	11,6
Stearinsäure	1,5	1,1	1,3

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. AHRENS, E.H.
HIRSCH, J.
OETTE, K.
FARQUAHR, J.W.
STEIN, Y. Carbohydrate-induced and fat-induced
lipemia
Trans. Ass. Amer. Phyc. 74, 134
(1961)
2. AHRENS, E.H. The Management of Hyperlipidemia:
Whether, Rather than How
Ann. Int. Med. 85, 87-93 (1976)
3. ALLEN, R.J.L. The estimation of phosphorus
Biochem. J. 34, 858 (1940)
4. BARTLETT, G.R. Phosphorus assay in column matography
J. Biol. Chem. 234, 466 (1959)
5. BEHRENS, U. Über die Haltbarkeit von Plasmalipo-
proteinen bei Raumtemperatur oder im
Kühlschrank
Inaug.-Diss. Marburg 1976
6. BUBERL, W. Veränderungen in Lipidgehalt und Zu-
sammensetzung der VLDL, LDL und HDL
bei Hyperlipoproteinämien unter
Clofibrattherapie
Inaug.-Diss., Marburg, in Vorbereitung
7. BURCHARDT, H. Beiträge zur Kenntnis der Cholesterine
Inaug.-Diss., Rostock 1889
8. CARLSON, L.A.
RÖSSNER, S. Results of the Coronary Drug Project
- an Interpretation
Atherosclerosis, 22, 317-324 (1975)
9. CARLSON, L.A. Lipid Composition of the Major Human
Serum Lipoprotein Density Classes in
Different Types of Hyperlipoprotein-
emia
In Lipoprotein Metabolism Ed. H.
Greten,
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg,
New York, 69-79 (1976)

10. DEWAR, H.A. Trial of clofibrate in the treatment of ischaemic heart disease (five-year-study by a group of physicians of the Newcastle upon Tyne region)
Br. Med. J. 4, 767-775 (1971)
11. DITSCHUNEIT, H.
KLÖR, H.U.
DITSCHUNEIT, H.H. Effects of Essential Phospholipids on the Carbohydrate-Induced Hypertriglyceridemia
In Phosphatidylcholine, Ed. H. Peeters, Berlin, Heidelberg, New York 1976, 98
12. EGGSTEIN, M.
KREUTZ, F.H. Eine neue Bestimmung der Neutralfette im Blutserum und Gewebe, I. Mitteilung: Prinzip, Durchführung und Besprechung der Methode
Klin. Wschr. 44, 262 (1966)
13. EGGSTEIN, M.
KREUTZ, F.H. Eine neue Bestimmung der Neutralfette im Serum und Gewebe, II. Mitteilung: Zuverlässigkeit der Methode, andere Neutralfettbestimmungen, Normalwerte für Triglyceride und Glycerin im menschlichen Blut
Klin. Wschr. 44, 267 (1966)
14. EISENBERG, S.
BILHEIMER, D.W.
LEVY, R.I.
LINDGREN, F.T. On the metabolic conversion of human plasma very low density lipoprotein to low density lipoprotein
Biochim. Biophys. Acta 326, 361-377 (1973)
15. FEINSTEIN, A.R. The clofibrate trials: another dispute about contraindication therapy
Clin. Pharmacol. Ther. 13, 953-968 (1972)
16. FISKE, C.M.
SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus
J. Biol. Chem. 66, 375 (1925)
17. FOLCH, J.
LEES, M.
SLOANE-STANLEY, D.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues
J. Biol. Chem. 226, 497 (1957)
18. FREDRICKSON, D.S. A system for phenotyping hyperlipoproteinemia
Circulation 31, 321 (1965)

19. GOTTFRIED, S.P.
POPE, R.H.
FRIEDMAN, N.H.
AKERSON, I.B.
DI MAURO, S. Serum beta-lipoproteins of normal, atherosclerotic, and lipemic individuals
Clin. Chem. 1, 253 (1955)
20. HAVEL, R.J.
EDER, H.A.
BRAGDON, J.H. Composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum
J. Clin. Invest. 34, 1345-1358 (1955)
21. LEVY, R.I.
QUARFORDT, S.H.
BROWN, W.V. The efficacy of clofibrate (CPIB) in familial hyperlipoproteinemia
W.L. HOLMES, L.A. CARLSON and R. PAOLETTI (Eds.), Drugs Affecting Lipid Metabolism (Proceedings of the 3rd International Symposium on Drugs Affecting Lipid Metabolism, Milan, Italy Spet. 1968) Plenum Publishing Co., New York, N.Y. 377 (1969)
22. OLIVER, M.F. Ischaemic heart disease: a secondary prevention trial using clofibrate (report by a research committee of the Scottish Society of Physicians)
Br. Med. J. 4, 775-784 (1971)
23. PEETERS, H. The Biological Significance of the Plasma Phospholipids
In Phosphatidylcholine, Berlin, Heidelberg, New York 10 (1976)
24. RICHTERICH, R.
LAUBER, K. Bestimmung des Gesamtcholesterins im Serum, VIII. Mitteilung über Ultramikromethoden im klinischen Laboratorium
Klin. Wschr. 40, 1252 (1962)
25. ROSE, H.G.
HAFT, G.K.
JULIANO, J. Clofibrate-induced low density lipoprotein elevation: Therapeutic implications and treatment by colestipol resin
Atherosclerosis 23, 413-427 (1976)

26. SCHMIDT, F.H.
VAN DAHL, K. Zur Methode der enzymatischen Neutralfettbestimmung in biologischem Material
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 6, 156 (1968)
27. SCHNEIDER, J. Unveröffentlichte Ergebnisse
28. STEGIE, R. Der Paardifferenzen-W-Test zur Wirkungsbeurteilung klinischer Behandlungen in paarigen Stichproben
Drug Res. 26, 1708 (1976)
29. UNDEUTSCH, D. Fettstoffwechselstörungen
Physiologie und Pathophysiologie, Untersuchungsmethoden, Epidemiologie und Klinik
Schattauer-Verlag 85 (1975)
30. WAGENER, H.H.
FONTAINE, R.
NEUMANN, B. Pharmakologie "essentieller"
Phospholipide (EPL)
Drug Res. 9a, 1733-1742 (1976)
31. WATSON, D. A simple method for the determination of serum cholesterol
Clin. Chim. Acta 5, 637 (1960)
32. ZELIS, R.
AMSTERDAM, A.
SPANN, J.F.
MASON, D.T. Type IV hyperlipoproteinemia - Clofibrate without dietary therapy
J. Amer. Med. Ass. 222, 326 - 328 (1972)

Herrn Prof. Dr. Klaus danke ich für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Arbeit an der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg.

Besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Kaffarnik für die Überlassung des Themas aussprechen.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich auch Herrn Dr. J. Schneider für seine hilfreichen Hinweise zur Durchführung dieser Arbeit.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Hausmann, Herrn und Frau Drs. Mühlfellner und Herrn Dr. Schubotz für ihre Hilfe bei der Blutentnahme, sowie Herrn Diplom-Mathematiker Zöfel vom Rechenzentrum der Universität Marburg für die statistische Auswertung der Ergebnisse.

Danken möchte ich zuletzt auch Frl. E. Metzler für die Anfertigung der technischen Zeichnungen.

LEBENS LAUF

Am 16. Juni 1951 wurde ich als Tochter des Lehrers Rudolf Metzler und dessen Ehefrau Hilde, geb. Triesch in Sinn/Dillkreis geboren.

Nach unserem Umzug von Roth nach Heiligenborn wurde ich dort im Frühjahr 1957 eingeschult. 1961 wechselte ich auf das Johanneum-Gymnasium in Herborn über, wo ich am 3. Juni 1969 die Reifeprüfung im neusprachlichen Zweig ablegte.

Im Wintersemester 1969/70 begann ich an der Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn das Studium der Physik und Chemie.

Ab Oktober 1970 besuchte ich die MTA-Schule in Frankfurt.

Im Frühjahr 1971 setzte ich in Frankfurt an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität das Studium der Chemie fort.

Nach Anerkennung von zwei Semestern auf das Studium der Zahnheilkunde legte ich dort im Frühjahr 1972 die naturwissenschaftliche Vorprüfung ab.

Im Herbst 1972 begann ich an der Philipps-Universität Marburg das Studium der Zahnheilkunde.

Am 22. Juni 1973 heiratete ich in Mainz den Zahnarzt Raimund Müller.

Im März 1974 legte ich die zahnärztliche Vorprüfung ab und beendete am 19. November 1976 mein Studium mit dem Staatsexamen.

Marburg, den

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren
und Dozenten:

In Bonn :

Bennewitz, Daneel, Goslar, Passoth, Puff,
Scholtyseck, Tschesche, Wedemeyer

In Frankfurt :

Schmidt, Starck, Woenckhaus

In Marburg:

Ahrens, Amon, Baltzer, Bernhardt, Bode, Castenholz,
Haberich, Hennis, Hensel, Hering, Heuser, Janke,
Carlson, Kleinsasser, Koransky, Lauer, Maroske,
Petry, Portig, Rohen, Rupec, Schienbein, Schiff,
Schmidt, Schmitz-Mohrmann, Schnell, Schulte-Herrmann,
Seidel.

